

Sandra Ledig

Dr. med.

**Untersuchungen zur Rifampicin-Resistenz bei *Neisseria meningitidis*
Ursachen der *high range* Resistenz, Stabilität der Resistenz *in vitro* und Fitness der
geno-/phänotypischen Träger**

Geboren am 09.11.1975 in Ludwigshafen am Rhein

Reifeprüfung am 23.06.1995 in Ludwigshafen am Rhein

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1996 bis WS 2002/2003

Physikum am 26.03.1998 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 14.05.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. h.c. H.-G. Sonntag

Mit Hilfe von Wachstumsversuchen wurden Kurven erstellt, um das Wachstumsverhalten der Meningokokken in unterschiedlichen Flüssignährmedien zu untersuchen. Das Flüssignährmedium RPMI 1603 plus 10% FCS sowie die Inkubation der Bakterien bei 37°C, Raumluft und horizontalem Schütteln erwies sich am geeignetsten zur Anzucht der Meningokokken.

Die **Langzeitanzucht** über 36 Tage in RPMI 1603 wurde mit drei resistenten und einem Rifampicin-empfindlichen Meningokokkenstamm in zwei unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt. Ein resistenter Stamm verlor im Laufe der fünf Wochen seine Rifampicin-Resistenz (Revertant), wohingegen sich bei den anderen Stämmen keine Änderungen ergaben. Das subgenische *rpoB*-Fragment, welches für Resistenz oder Empfindlichkeit verantwortlich ist, wurde sequenziert. Die Ergebnisse von allen in die Langzeitanzucht eingesetzten Stämmen –vor und nach Ende der Anzucht– erbrachten zwei Unterschiede in der Basensequenz. In der abgeleiteten Aminosäuresequenz wies der empfindliche Revertant des zuvor resistenten Stammes 184/96 an Position 552 ein Histidin (Wildtyp) anstatt eines

Tyrosins (resistenter Genotyp) auf. Der empfindliche Stamm B5535 zeigte an Position 447 die Substitution eines Tyrosins durch Asparagin, was aber keine Änderung der Resistenzlage nach sich zog.

Die Substitution des Revertanten bestätigt damit erneut den in der Literatur vielfach auch bei anderen Bakterienarten beschriebenen **Mechanismus der Rifampicin-Resistenz**. Dabei handelt es sich um singuläre Punktmutationen im *rpoB*-Gen der β -Untereinheit der RNA-Polymerase, die sprunghaft erworben und –erstmalig experimentell gezeigt– auch wieder verloren werden können. In Bezug auf die **Stabilität** der Mutation folgt aus dieser Arbeit eine geringe Rückmutationshäufigkeit von 1 in 3720 ($2,7 \times 10^{-4}$) Generationen. Diese geringe Häufigkeit führt zu einer verhältnismäßig großen Stabilität. Im Zusammenhang mit dem Resistenzmechanismus muss weiterhin beachtet werden, dass der resistente Stamm 184/96 eine sogenannte **high level Resistenz** mit einer MHK > 256 $\mu\text{g/ml}$ aufwies. Die Tatsache, dass der Stamm auch diese nur in einem Schritt verlor, stellt Beschreibungen in der Literatur in Frage, die einen zusätzlichen molekularen Mechanismus bei dem Erwerb von *high level* Resistenz diskutieren. Zum Ausschluss dieses additiven Mechanismus in Form einer Mutation im sogenannten **mtr-Genkomplex** wurde in dieser Arbeit dennoch eine PCR durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse der PCR kann diese Mutation als Ursache der *high level* Resistenz ausgeschlossen werden. Als zusätzlicher Resistenzmechanismus könnte lediglich eine nicht weiter charakterisierbare Umweltanpassung (phänotypische Adaptation?) in Frage kommen.

Die **Prävalenz** Rifampicin-resistenter Meningokokken liegt in Ländern wie Nigeria mit ungefähr 10-25% verhältnismäßig hoch. In solchen Fällen muss durch die Behandlung von Tuberkulose-Patienten mit Rifampicin ein gewisser Selektionsdruck postuliert werden. Die in dieser Arbeit beobachtete geringe Rückmutationshäufigkeit resistenter Meningokokken, wie auch ihre im Vergleich zu empfindlichen Stämmen gezeigte geringere Fitness (messbar als verlangsamte Wachstumsgeschwindigkeit), liefern weitere Erklärungen für die beschriebene hohe Prävalenz. Die Rifampicin-Resistenz stellt damit ein nicht zu unterschätzendes Problem bei der Behandlung von Meningokokken-Erkrankungen dar.

Die zu Beginn dieser Arbeit in unterschiedlichen Medien angezüchteten Meningokokken wurden in einem **Vollblut-Infektionsmodell** auf ihre Virulenz gescreent. Die **Überlebensrate** der Meningokokken in diesem Vollblutmodell war sowohl von den Anzuchtbedingungen vor dem Einsatz in das Vollblut als auch von den unterschiedlichen Blutspendern abhängig. Auf festen Nährböden angezüchtete Meningokokken proliferierten im Blut. Diese Vermehrung könnte eine Erklärung für das rapide Fortschreiten der Krankheit nach Eintritt

der Bakterien in die Blutbahn liefern. Die Messung der **Zytokinfreisetzung** (TNF- α , IL-6, IL-10 und IL-1 β) im Blut erfolgte mittels ELISA. Sowohl die Ergebnisse der Überlebenskinetik als auch die der Zytokinmessung stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Abläufen während einer schweren Meningokokkensepsis überein. Unterschiede im Ausgang der Vollblutmodell-Versuche zeigen jedoch eine gewisse Abhängigkeit von der zur Anzucht der Meningokokken verwendeten Medien.